

File 1:ERIC 1966-1997/Mar
(c) format only 1997 Knight-Ridder Info

Set	Items	Description
-----	-------	-------------

?b 351

06may97 14:09:06	User105551	Session D189.1
Sub account: 006910.0908 POSORSKE		
\$0.36	0.012 Hrs	File1
\$0.36	Estimated cost File1	
\$0.14	SPRNTNET	
\$0.50	Estimated cost this search	
\$0.50	Estimated total session cost	0.012 Hrs.

File 351:DERWENT WPI 1981-1996/UD=9718;UA=9715;UM=9710
(c)1997 Derwent Info Ltd

*File 351: *** WPI will be offline between 4pm and 5pm PDT today
in preparation for the release of the reloaded database. ***

Set	Items	Description
-----	-------	-------------

?S PN=JP 3076583

S1	1	PN=JP 3076583
----	---	---------------

?

t s1\9/all

1/9/1

DIALOG(R) File 351:DERWENT WPI

(c)1997 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008633930 WPI Acc No: 91-137960/19

XRAM Acc No: C91-059664

Expression of human protein in blue-green algae - comprises inserting
e.g. recombinant plasmid contg. amino acid sequence for human
superoxide dismutase into algal cells

Index Terms: EXPRESS HUMAN PROTEIN BLUE GREEN ALGAE; COMPRISE RECOMBINATION
PLASMID CONTAIN AMINO ACID SEQUENCE HUMAN SUPER OXIDE DISMUTASE ALGAE
CELL INSERT

Patent Assignee: (TOKY-) TOKYO YAKUHHIN KAIHA

Number of Patents: 001

Patent Family:

CC Number	Kind	Date	Week
JP 3076583	A	910402	9119 (Basic)

Priority Data (CC No Date): JP 89210129 (890816)

Abstract (Basic): JP 3076583

A recombinant plasmid or an expressing DNA fragment, which
contains a DNA sequence of coding for a polypeptide having the same
amino acid sequence as human superoxide dismutase, is inserted into
blue-green alga cells, and the transformant blue-green alga cells are
incubated in a medium to produce the polypeptide.

The polypeptide to be produced by the process has a specific
amino acid sequence of 153 amino acids.

USE/ADVANTAGE - Industrial and biotechnological mass-prodn. of a
human protein (human superoxide dismutase, h-SOD) is possible. @(13pp
Dwg.No.0/0)@

File Segment: CPI

Derwent Class: B04; D16;

Int Pat Class: C07K-013/00; C12N-001/13; C12N-015/74; C12P-021/02;

C12R-001/89

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02B3; B04-B02C2; B04-B04A1; D05-C03B; D05-H12

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M720 M903 N132 N135 Q233 V802 V811

02 M423 M710 M903 N135 Q233 V753

?

TOKYO PHARM. DEVELOP. 4/2/91 #3,076,583 EXPRESSION OF HUMAN PROTEIN IN CYANOBACTERIUM

⑩日本国特許庁(JP)

⑪特許出願公開

⑫公開特許公報(A) 平3-76583

⑤Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 平成3年(1991)4月2日

C 12 N 15/74

C 07 K 13/00

C 12 N 1/13

C 12 P 15/53

/(C 12 N 21/02

C 12 R 1/13

C 12 R 1:89

(C 12 P 21/02

C 12 R 1:89

ZNA

C

8619-4H

8214-4B

8717-4B

8717-4B

HIDEAKI OGIWARA
(HAGIWARA)

YASUNARI TAKEJIMA
(KOSEI)

C 12 N 15/00

A

A

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全13頁)

⑭発明の名称 ヒトタンパク質のラン藻での発現方法

⑮特 願 平1-210129

⑯出 願 平1(1989)8月16日

⑰発 明 者 萩 原 秀 昭 兵庫県加西市別府町甲1556

⑱発 明 者 竹 嶋 康 誠 兵庫県加西市別府町甲1556

⑲出 願 人 萩 原 義 秀 兵庫県宝塚市平井山荘4-14

⑳出 願 人 東京薬品開発株式会社 東京都千代田区鍛冶町1-7-2 松田ビル2F

㉑代 理 人 弁理士 小田島 平吉 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

ヒトタンパク質のラン藻での発現方法

2. 特許請求の範囲

1. ヒト・スーパーオキシドジスムターゼと実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA配列が導入された組換えプラスミドまたは発現可能なDNA断片で形質転換されたらん藻細胞を培地で培養することを特徴とするらん藻細胞における上記ポリペプチドの発現方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はヒト・スーパーオキシドジスムターゼ(以下、h-SODと省略する)と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNA配列をらん藻細胞内で発現させる方法に関する。

〔従来の技術〕

ヒト・スーパーオキシドジスムターゼ(h-

SOD)は生体内に生じる活性酸素(O_2^- 、 1O_2 、 OH^- など)の濃度を低下させ、生体成分が非特異的に酸化されるのを防ぐ機能をもつと考えられている。そのことから、h-SODは炎症など活性酸素が関与する病気(例えば慢性関節リウマチ、変形性関節炎、放射線・紫外線照射による障害、虚血部分への血液再流に伴う障害など)に有効な治療薬として注目されている。

ヒト赤血球Cu/Zn-SODについてはそのアミノ酸配列が報告され(Jabusch et al., Biochemistry, 19 (1980) 2310-2316, Barra et al., FEBS Letters, 120 (1980) 53-55)、また、ダウン症候群患者に由来する樹立細胞株より分離されたmRNAから得られたcDNAの塩基配列についても開示されている(Sherman, L. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 80 (1983) 5465-5469)。また、h-SODは遺伝子操作により大腸菌、酵母での発現も報告されており、(R. A. Hallewell et al. Nucleic Acid Research 13, (6) (1985) 2017-2034, R. A.

Ogiwara, H (1991)

3

Hallewell et al. Bio/Technology. 5 (1987) 363~366]、組換え h-SOD の大腸菌、酵母による大量生産も可能になっている。

一方、らん藻細胞は、光と少量の無機塩類を含む水とがあれば増殖することが可能であり、培養が簡単であるため、遺伝子操作のための宿主として好適であると考えられる。

従来、らん藻細胞を宿主として遺伝子操作を行った例としては、アナキステイス・ニデュランス (Anacyclops nidulans) にアンピシリンおよびクロラムフェニコール耐性遺伝子、アナキステイス・ニデュランスの rRNA 遺伝子およびリボソームリジン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RuBisCO) 遺伝子を導入したもの [C. J. Kuhlmeier et al., Mol. Gen. Genet. 184: 249-254 (1981); S. S. Golden and L. A. Sherman, J. Bacteriology 155: 966-972 (1983); H. Daniell et al., Arch. Microbiol. 151: 59-64 (1989)]、アナベナ (Anabaena) にク

ロラムフェニコール、ストレプトマイシン、ネオマイシンおよびエリスロマイシン耐性遺伝子を導入したもの [C. P. Wolk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1561-1565 (1984)]、シネコシステイス (Synechocystis) にカナマイシン耐性遺伝子を導入したもの [F. Chauvat et al., Mol. Gen. Genet. 216: 51-59 (1989)] 等が知られているが、原子動物であるらん藻細胞にヒト又は動物の遺伝子を組み込み、それを発現させることに成功した例は未だ報告されていない。

本発明者らは、遺伝子組換え技術による h-SOD 遺伝子の発現のための宿主としてらん藻細胞を用いることに着目し、鋭意研究を行なった結果、今回、h-SOD 遺伝子を成る種のベクターまたは発現能力を持つ DNA 断片に導入し、得られる組換えプラスミドまたは DNA 断片でらん藻細胞を形質転換し、h-SOD を発現させることに成功し、本発明を完成するに至った。

かくして、本発明によれば、ヒト・スーパーオ

キシドジスムターゼと実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする DNA 配列が導入された組換えプラスミドまたは発現能力をもつ DNA 断片で形質転換されたらん藻細胞を培養地で培養することを特徴とするらん藻細胞における上記ポリペプチドの発現方法が提供される。

ヒト・スーパーオキシドジスムターゼ (h-SOD) は、153 個のアミノ酸から構成されるポリペプチドであり、そのポリペプチド部分のアミノ酸配列は次のとおりである。

1	10
Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly	
20	
Asp Gly Pro Val Glu Gly Ile Ile Asn Phe	
30	
Glu Glu Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys	
40	
Val Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu	
50	
Gly Leu His Gly Phe His Val His Glu Phe	
60	
Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala	
70	

Gly Pro His Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys	
80	
His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg His	
90	
Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp	
100	
Lys Asp Gly Val Ala Asp Val Ser Ile Glu	
110	
Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His	
120	
Cys Ile Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His	
130	
Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly Lys Gly Gly	
140	
Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala	
150	
Gly Ser Arg Leu Ala Cys Gly Val Ile Gly	
Ile Ala Glu	

本明細書において「ヒト・スーパーオキシドジスムターゼと実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド」とは、上記アミノ酸配列を有する h-SOD ポリペプチドの他に、h-SOD としての酵素活性を実質的に失うことがない範囲内で、上記 153 個のアミノ酸の一部（一般には 5

3-76583(2)

マイシン、ネオ
・耐性遺伝子を導
1., Proc. Nat
1561-15
ステイス (Synec
遺伝子を導入した
ol. Gen. Gene
9)] 等が知ら
も菌細胞にヒト又
れを発現させるこ
ていない。
技術によるh-S
としてらん菌細胞
究を行なった結果、
1のベクターまた
導入し、得られる
断片でらん菌細胞
見させることに成
た。

ヒト・スーパーオ

Leu Ser Arg Lys

80

Ile Glu Arg His

90

Val Thr Ala Asp

100

Val Ser Ile Glu

110

Ser Gly Asp His

120

Leu Val Val His

130

Gly Lys Gly Gly

140

Thr. Gly Asn Ala

150

Gly Val Ile Gly

スーパーオキシドジ
アミノ酸配列を有す
アミノ酸配列を有す
2に、h-SODとし
うことがない菌細胞
の一部（一般には5

個以下、好ましくは2個以下）が他のアミノ酸と
置き換ったh-SODに類似するポリペプチド（以
下、h-SOD類似体という）をも包含する意味
で使用するものである。そのようなh-SOD類
似体の具体例としては、例えば、

- (a) h-SODの6番目のシステイン残基
(Cys) がアラニン残基 (Ala) に置き換っ
たもの（特願昭63-311013号明細
書参照）、
- (b) h-SODの111番目のシステイン残基
(Cys) がセリン残基 (Ser) に置き換っ
たもの（特願昭62-130684号明細
書参照）、
- (c) h-SODの6番目のシステイン残基
(Cys) がアラニン残基 (Ala) に、そし
て111番目のシステイン残基 (Cys) が
セリン残基にそれぞれ置き換ったもの（特
公昭63-273473号明細書参照）

等が挙げられる。

ヒト・スーパーオキシドジスムターゼと実質的

40
GTT TGGGGTCTTA TCAAAGGCCCT GACCGAA
CAA ACCCCAAGAT AGTTTCCGGA CTGGATT

50
GGT CTGCATGGAT TCCATGTTC TGAATTT
CCA GACGTACCTA AGGTACAAGT ACTTAAA

60
GGT GACAACACTG CAGGTTGCAC CTCTGCA
CCA CTGTTGTGAC GTCCAACGTG GAGACGT

70
GGG CCTCATTTC AACCCTGTG CCGTAAA
CCC GGAGTAAAGT TGGCGACAG CCGATTT

80
CATGGTGGGCGA AAGACGAAGA ACOTCAT
GTACCACCGGCT TTCTGCTTCT TGCAGTA

90
GTT GGTGACTAGG TAACGTTACC GCTGAC
CAA CCACTGATCC ATTGCAATGG CGACTG

100
AAAGACGGTGTGCG TGACGTTTCT ATCGAA
TTTCTGCCACAGCG ACTGCAAGA TAGCTT

110
GACT CTGTTATCTC TCTGTCTGGT GACCAT
CTGA GACAATAGAG AGACAGACCA CTGGTA

120
TGCATCATCGGTG TACTCTGGTT GTTCAT
ACGTAGTAGCCAGC ATGAGACCAA CAAGTA

130
GAAA AAGCGGATGA CCTGGGTAAA GGTGGT
CTTT TTCGCTACT GGACCCATTT CCACCA

に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（以
下、本件ポリペプチドという）、をコードするDN
A配列はそれ自体既知の遺伝子操作技術によつて
容易に合成することができ、例えば下記の文献：

- (1) 日本生化学会編 「脱生化学講座1遺伝子
研究法II」 東京化学同人刊(1987年)
(2) 村松正実編 「医学における遺伝子工学」
東京化学同人刊(1987年)

等の実験書に記載されている方法によつて合成す
ることができる。

このようにして合成されるh-SODをコード
するDNA配列の一例を示せば次のとおりである。

10
GCT ACCAAAGCTG TTTGCGTTCT GAAAGGT
CGA TGGTTTCGAC AAACGCAAGA CTTTCCA

20
CACGGCCCCGGTTC AGCGTATCAT CAACTTC
CTGCCGGGCCAAG TCCCATAGTA GTTGAAG

30
GAA CAGAAAAGAT CTAACGGTCC GGTAAAA
CTT GTCTTTCTTA GATTGCCAGG CCAATTT

140
AACCAGGAATCTAC CAAAACCGGT AACGCT
TTGCTCCTTAGATG GTTTTGCCA TTGCGA

150
GGTT CTCGTCTGGC ATGCGGTGTT ATCGGT
CCAA GAGCAGACCG TACGCCACAA TAGCCA

ATCGCTCAG
ATCGGAGTC

なお、上記DNA配列の上流側末端には適宜、
ノチオンをコードする ATG が結合していても
よい。

上記DNA配列はあくまでも一実施形態であり、
前記のアミノ酸配列をコードするものである限り、
DNA配列は変更可能であることはいうまでもな
い。

また、前記(a)のh-SOD類似体をコードす
るDNA配列の一例としては、上記h-SODを
コードするDNA配列の点線で囲んだ部分を GCT
CGA
に置き換えたものを例示することができる。

このようにして合成される本件ポリペプチドを
コードするDNA配列は次いで適当なベクターま

たは発現能力をもつDNA断片に組み込む。そのために使用しうるベクターまたは発現可能なDNA断片としては、らん藻細胞に導入可能なものであれば特に制限されるものではなく広範囲の種類のベクターまたはDNA断片から選ぶことができ、プラスミド及びウイルスから必要に応じて誘導することができる。ベクターは単コピーベクター又は低コピーもしくは高コピーベクターのいずれであつてもよく、クローニング及び/又は発現のために機能するものである。ベクターに関しては多くの文献が存在し、また、多くのベクターまたはDNA断片は商業的に入手可能である。これらのベクターまたは発現可能なDNA断片は通常、選択を可能にするマーカーを含有し、このマーカーとしては細胞耐性、栄養要求性などがあり、しばしば異なる特性をもたらし多数のマーカーを1ベクターまたは1DNA断片に使用される。また、発現ベクターまたは発現可能なDNA断片の場合には転写開始および停止の両制御シグナルが存在する。

用いることも可能である。プロモーターは *tac* プロモーターの他、*glnA* プロモーター (*Anabaena*)、*ps2B* プロモーター (*Fremyella*)、*rbc* プロモーター (*Anacystis*)、*rRNA* プロモーター (*Anacystis*)、*atp1*、*atp2* プロモーター (*Anabaena*, *Synechococcus*)、*petF1* プロモーター (*Anabaena*, *Synechococcus*)、*cpcB1A1E* プロモーター (*Calothrix*)、*cpc* プロモーター (*Synechococcus*, *Anabaena*)、*sod* プロモーター (*Anacystis*) などが挙げられる [N. E. Tumer et al., *Nature*, 306: 337~342 (1983); B. Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(9): 2693~2697 (1984); 熊野正信、杉浦昌弘、「遺伝」38(12)26~31(1984); S. E. Curtis, *Photosynthesis Research*, 18: 223~244 (1988); J. V. D. Plas et al., *Photosynthesis Research*, 18: 179~204 (1988); N. T. D. Marsac et al., *Photosynthesis Research*]

このような有利に利用できる発現用ベクターとしては、例えば *plac 11* (ATCC 37145)、*plac 12* (ATCC 37138)、*pKK 223-3* などの *plac* プロモーター [H. A. deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 21 (1983)] を含有するベクター; *pAH 5*、*pAH 9* などの *ADC 1* プロモーターを含有するベクター; プラスミド *pSV 2* などの *SV 40* 系ベクター等が挙げられる。さらに、らん藻細胞用のベクターとして「植物遺伝子操作技術-遺伝子組換えと細胞融合-」山口雪之監修(シーエムシー刊)98~110頁に記載されているプラスミド *pBAS 18*、*pUC 104*、*pUC 105*、*pUC 303* 等もまた使用可能である。

本件ポリペプチドをコードするDNA配列をらん藻細胞に導入するためのベクターまたは発現可能なDNA断片プロモーター、オペレーター、*SD* (Shine-Dalgarno) 配列、翻訳開始コドン、終止コドン、ターミネーターがこの順に配置されていることが必要である。プロモーターは1つである必要はなく、2つのプロモーターを縦列させ

8: 99-132 (1988); D. E. Lauderbach et al., *Mol. Gen. Genet.* 216: 455-461 (1989)]。

一方、本件ポリペプチドが導入された組換えベクターまたは発現可能なDNA断片を組み込むことのできるらん藻細胞としては、例えばアナキステイス・ニデュランズ (*Anacystis nidulans*)、アグメネルム・クオドルプリカトゥム (*Agmonellum quadruplicatum*)、アナベナ (*Anabaena*)、ネンジュモ (*Nostoc*)、ユレモ (*Oscillatoria*)、スピルリナ (*Spirulina*)、イトヒゲモ (*Calothrix*)、フレミエラ (*Fremyella*)、スイゼンヅノリ (*Aphanotheca*)、アイミドリ (*Brachytrichia*)、シネコシステイス (*Synechocystis*) 等が挙げられ、それぞれの宿主に適したベクターまたは発現可能なDNA断片を選択使用することにより、形質転換らん藻細胞を造成することができる。

本件ポリペプチドをコードするDNA配列と適当なベクターまたはDNA断片とからの組換えプ

-76583(4)

用ベクターと
17145)、*ptac*
どの *ptac* プロ
Proc. Natl.
を含有するベ
OC | プロモー
ミド *pSV 2* な
れる。さらに、
植物遺伝子操作
山口孝之監修
頁に記載されて
C104、*pU*
用可能である。
DNA配列をら
ーまたは発現可
ベレーター、*S*
開始コドン；
の順に配置され
ーターは1つで
ターを縦列させ

D. E. Laude
et. 216:4

された組換えベ
片を組み込むこ
例えば *Anakis*
is nidulans)、
ウム (*Agave*)
 (*Anabaena*)、
Oscillatoria)、
ヒゲモ (*Calot*
lla)、スイゼン
ドリ (*Brachyt*
ynochocystis)
選したベクター
使用すること
成することがで

DNA配列と選
からの組換え

ラスミドまたは発現可能なDNA断片の造成もま
た、遺伝子操作における周知の技術を用いて行な
うことができ、例えば下記の文献：

- (1) T. Maniatis et al., *Molecular Cloning - a Laboratory Manual* - Cold Spring Harbor Laboratory 刊、
- (2) L. G. Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier 刊
- (3) Ray Wu et al., *Methods in Enzymology*, 101, Academic Press 刊

等の実験書に記載の方法によつて造成することが
できる。

たとえば、適当に選択されるベクターまたは発
現可能なDNA断片に化学合成した本件ポリペプ
チドをコードする遺伝子、形質発現調節遺伝子を
含むDNA断片、合成DNA断片を正しく組込む
ことにより目的の組換えDNAが得られる。その
概略を添付第1図に示す。DNA断片の連結順序
は最終的に得られる組換えDNAの構造が目的と
するものである限り特に制限されるものではない。

する。形質転換体はアンピシリン耐性などにより
選抜した後、イムノブロッティング法により、所
期の形質転換体を得られていることを確認するこ
とができる。

このようにして調製される形質転換体は、光の
照射下に宿主細胞の増殖に応じたそれ自体既知の
培地で培養することにより本件ポリペプチドの発
現を行わせる。培地は適当量の銅及び/又は亜鉛
イオンを含むことが好ましい。

アナキステイス・ニデユランスの場合、培地と
してはBG-11培地、MDM培地などが適して
おり、また培養条件として、培養温度は一般に1
0〜30℃、好ましくは25℃付近が適しており、
またpHは通常7〜8の範囲及び光度は1000〜
3000 luxの範囲が適している。このような条
件下に培養は5〜20日程度行なうことができる。
また、培養は静置又は攪拌下に行なう。対数増殖
期初期に1〜2 mMのイソプロピルーβ-D-チオ
ガクトピラノシド (IPTG) を添加すること
により誘発合成を行なつてもよい。

このようにして造成される組換えプラスミドま
たは発現可能なDNA断片によつて前述したらん
菌細胞を形質転換する。

得られる組換えDNAによる宿主の形質転換は
それ自体既知の方法によつて行うことができる。
例えば遺伝子操作に関する多数の文献たとえば、

- (1) 高木康敬ら、「遺伝子操作マニュアル」
腐談社刊、
- (2) 高木康敬ら、「遺伝子操作実験法」
腐談社刊、
- (3) T. Maniatis et al., *Molecular cloning - a Laboratory Manual* - Cold Spring Harbor Laboratory 刊、
- (4) L. G. Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier 刊

などの実験書に記載の方法従つて行なうことが
できる。

例えば、*h-SOD*をコードするDNA配列を
有する *pK223-3* をアナキステイス・ニデユラン
スへエレクトロポレーション法で導入し形質転換

培養後の培養物からの産生された本件ポリペプ
チドの採取はそれ自体既知の方法で行なうことが
できる。例えば、培養後、遠心分離で細胞を集め、
破碎したのち、通常知られている方法、例えば塩
析、芳析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル
ろ過クロマトグラフィー、クロマトフオーカプシ
ング、ハイドロフオービツクインターアクション
クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグ
ラフィー、電気泳動などの操作を適宜組合せるこ
とにより本件ポリペプチドを分離回収することが
できる。

このようにして製造される本件ポリペプチドは、
活性酸素が関与する病気、例えば慢性関節リウマ
チ、変形性関節炎、放射線・紫外線照射による障
害、血行障害等の治療、処置、予防のための医薬
や化粧品等に利用することができる。

次に実施例により本発明をさらに具体的に説明
する。

実施例1 (example)

(1) *h-SOD* 遺伝子の化学合成

(1-1) オリゴスクレオチドの合成および精製
完全鎖長(475bp)の遺伝子を作製するために17の断片に分け(第2図参照)、17のオリゴスクレオチド(35b~61b)をDNAシンセサイザー380A(アプライド・バイオシステムズ・ジャパン社製)を用いてホスホアミダイド法により合成を行った。合成が終了したシリカゲルカラムに2μgのアモニア水(27%以上)を0.5μgずつ15分おきに加え、オリゴスクレオチドをシリカ支持体より切り出しバイアルに捕集した。このバイアルにさらに1μgのアモニア水を加え、キャップおよびパラフィルム等によりシールして55℃で8時間以上加熱し、塩基部分の保護基(アシル基)をはずした。恒温槽よりバイアルを取り出し室温に戻した後、キャップをはずし、減圧下で濃縮乾燥した。乾燥後、残渣を200μgの0.01Mトリエチルアミン-酢酸溶液(TEAA、pH7.5)に溶解し、AM-313-ODS(山村化学研究所製)カラムを用いたHPLCでアセトニトリル0.1M TEAAの濃度勾配による溶

出を行いメインピークを分取した。分取したメインピークを減圧下で濃縮乾燥した後、80%酢酸(アセトニトリル溶液)100μgを加え、混合して室温に30分間放置することにより、5'末端のジメチルトリチル(DMT)をはずし、OH基に変換した。30分経過後、迅速に乾燥し、残渣を0.01M TEAA(pH7.5)200μgに溶解し、等容のジエチルエーテルを加え、DMTを抽出除去した。この溶液を減圧下で濃縮乾燥した後、110μgの0.01M TEAA(pH7.5)に溶解し、再びHPLCを用いて、分取、精製を行った。分取したオリゴスクレオチドを含む溶液を減圧下で乾燥した後、10mMトリス塩酸-1mM EDTA溶液(TE、pH8.0)に溶解し、以下の実験に使用した。

(1-2) 合成オリゴスクレオチドのキナーゼによるリン酸化

精製したオリゴスクレオチドは完全鎖長ヒト型SOD遺伝子の5'末端に位置するNo.1およびNo.17を除き5'末端のリン酸化を行った。各

オリゴスクレオチド4μgを50mMトリス塩酸-10mM MgCl₂-0.1M EDTA-5mMジチオスレイトール(DTT)-0.1mMスベルミジン-1.7μMATP溶液(pH7.6)1.20μgに混合し、T、ポリスクレオチドキナーゼ9単位(宝酒造社製)を添加し、37℃で15分間インキュベートした。次にATPを終濃度1mMになるように加え、再度T、ポリスクレオチドキナーゼ9単位を添加し、37℃で25分間インキュベートした。反応後、90℃、5分間処理してT、ポリスクレオチドキナーゼを失活させた。この溶液に等容のフェノールを加え、攪拌したのち、15000rpm、4℃、2分間の遠心で水層を分取した。この水層に等容のクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)を加え、攪拌、遠心することによりフェノールを抽出除去した。この水層に60%の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)および2.5容のエタノールを加え、-20℃で2時間以上放置した。沈殿を15000rpm、4℃、7分間遠心して集め、-20℃で冷した70%エ

タノールで2回洗浄し、減圧下でアルコール分を除いた。残渣を10μgの10mMトリス塩酸-1mM EDTA溶液(TE、pH8.0)に溶解し、次の実験に使用した。

(1-3) T、DNAリガーゼによる合成オリゴスクレオチドの連結(DNAブロックI~Vの作製)

完全鎖長遺伝子合成のために17のオリゴスクレオチドを5つのブロック(I~V)に分け、T、DNAリガーゼにより連結した(第3図参照)。各ブロックを構成するオリゴスクレオチドのうち上下各ストランドの5'末端に位置するオリゴスクレオチド1.5μg、その他のオリゴスクレオチド1μgを50mMトリス塩酸-10mM MgCl₂溶液(pH7.6)80μg中に混合した。この溶液を90℃、5分間加熱した後、2時間かけて4℃まで冷却し、100mMジチオスレイトール(DTT)と10mM ATPを10μgずつ加え、さらにT、DNAリガーゼ(宝酒造社製)2.5unitsを添加して4℃で15時間インキュベートした。

た。分取したメ
た後、80%酢酸
を加え、混合
により、5'末
r)をはずし、0
、迅速に乾固し、
pH 7.5) 200
エーテルを加え、
り溶液を減圧下で
0.01M TEA
HPLCを用いて、
オリゴヌクレオチ
た後、10 mMト
E (TE, pH 8.0)
用した。
チドのキナーゼに

完全鎖長ヒト型
るNo. 1および
化を行った。各

アルコール分を
(トリス塩酸-1
.0)に溶解し、

による合成オリゴ
DNAブロック

7のオリゴヌク
V)に分け、

(第3図参照)。
レオチドのうち

とするオリゴヌ
リゴヌクレオチ

0 mM MgCl₂
した。この溶

2時間かけて4
レイトール(D

ずつ加え、さ
製) 2.5 unit

ユベートした。

反応液を等容のフェノールで処理し、クロロホルム抽出を2回行いフェノールを除去した。この溶液に3倍容のn-ブタノールを加え、攪拌、遠心して沈降し、残余のn-ブタノールをクロロホルムにより抽出除去した。この溶液に1/6容の電気泳動用マーカー(0.25%ブロモフェノールブルー、0.25%キシレンシアノール、30%グリセロール)を加え、8%ポリアクリルアミドゲルにのせ、89 mMトリスホウ酸-2 mM EDTA (TBE, pH 8.0) 緩衝液で200 V、4時間電気泳動を行った。泳動後、ゲルを0.5 μg/μlのエチジウムブロマイド溶液(TBE中)に15分間浸漬し、DNAの染色を行った。染色したゲルをトランスイルミネーター上にのせ、紫外線をあてて目的とするDNAを含むバンドを切り出した。このゲルを5 μl用のディスプレイ用注射筒に入れ、18 Gの針をつけ、ゲルを針先から押し出すことにより細かく砕いた。細かく砕いたゲルを1.5 μl用エペンドルフチューブに入れ、20 mMトリス塩酸-1.5 mM EDTA溶液(pH 8.0)

0 mMトリス塩酸-10 mM MgCl₂溶液(pH 7.6) 40 μlに混合し、37℃で30分間インキュベートした後、4℃まで30分間で冷却した。この溶液に100 mM DTT、10 mM ATPをおのおの5 μlずつ加え、さらにT, DNAリガーゼ(宝酒造社製) 10 unitsを添加して4℃、15時間反応させた。この反応液に等容のフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール(25:24:1)を加え攪拌、遠心して水層を得た。これに電気泳動用マーカーを1/6容加え、6%ポリアクリルアミドゲルにのせTBE緩衝液で200 V、6時間電気泳動を行った。泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド染色した後、トランスイルミネーター上で目的とするDNAバンドを切り出した。切り出したゲルから(I-3)と同様にDNAを抽出し、Nensorb 20を用いて精製した。

(I-5) 完全鎖長遺伝子のクローニング

1) 完全鎖長ヒト型SOD遺伝子約1 μgを120 μlの50 mMトリス塩酸-10 mM MgCl₂-0.1 mM EDTA-5 mM DTT-0.1 mM

500 μgを加え、37℃で1晩浸漬することにより目的のDNAを抽出した。抽出液にトリエチルアミンを最終濃度が10 mMになるように加え、0.1 Mトリス塩酸-10 mMトリエチルアミン-1 mM EDTA溶液(pH 7.7)で平衡化した核酸精製用カートリッジNensorb 20 (Du pond社製)に通すことによりDNAを吸着させた。カートリッジに3 μlの0.1 Mトリス塩酸-1 mM EDTA溶液(pH 7.7)および滅菌水を流して洗浄した後、DNAを50%メタノール(高速液体クロマト用)溶液として溶出した。溶出液を減圧下で濃縮乾燥した後、残渣を10 μlの滅菌水に溶解した。

(I-4) T, DNAリガーゼによるブロックの連結-完全鎖長遺伝子の作製

前記(I-3)で連結した5つのDNAブロック(I、II、III、IV、V)を第3図に示すように2つずつT, DNAリガーゼにより連結し、完全鎖長のヒト型SOD遺伝子を作製した。

調合せの2ブロックをそれぞれ0.5 μgずつ5

スベルミジン-1.7 μM ATP溶液(pH 7.6)と混合し、T,ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造社製) 9 unitsを添加し、37℃、15分間インキュベートした。次にATPを最終濃度1 mMになるように加え、再度T,ポリヌクレオチドキナーゼ9 unitsを添加し、37℃で25分間インキュベートした。反応後、等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を加え攪拌したのち15000 rpm、2分間の遠心で水層を得た。この水層に等量のクロロホルムを加え攪拌、遠心することにより残余のフェノールを抽出除去した。この水層に1/6容の3 M酢酸ナトリウム(pH 4.8)および2.5容のエタノールを加え、-20℃で2時間以上放置した。沈降を15000 rpm、4℃で7分間遠心して集め-20℃に冷した70%エタノールで2回洗浄し、減圧下でアルコール分を除いた。こうして0.8 μgのリン酸化ヒト型SOD遺伝子が得られ、40 μlのTEに溶解し、次の実験に使用した。

2) リン酸化ヒト型SOD遺伝子30 ngおよ

び制限酵素、HindIII、BamHIで切断したpUC13 280ngを7.5μlの0.1Mトリス塩酸-5mM MgCl₂溶液に混合し、60μlのTakara ligation Kit(宝酒造社製)A液を加え、よく攪拌した。この溶液に7.5μlのligation KitB液を加えよく攪拌した後、16℃で30分間インキュベートした。反応後、この溶液をE. coli JM109株の形質転換に使用した。

3) ヒト型SOD遺伝子を挿入したpUC13 40ng(10μl)に50mM CaCl₂処理したE. coli JM109株の細胞懸液200μlを加え、おだやかに混合した。混合液を氷水中で30分間インキュベートした後、さらに42℃で3分間インキュベートしてDNAを細胞中にとりこませた。この懸液に1mlの2XYTmedium(16g/lバクトトリプトン、10g/l酵母抽出エキス、5g/l NaCl)を加え、振盪しながら37℃で1時間インキュベートした。この細胞懸液を25、50、100、200および400μlとり2XYT寒天培地(50μg/mlアンピシリン、

40μg/45-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-チオガラクトシド(X-gal)、23、83μg/4イソプロピル-β-D-チオガラクトシド(1PTG)、1.5%寒天を含む)上にプレートした。このプレートを37℃で24時間インキュベートし、得られた白いコロニーを新しい2XYT寒天培地(アンピシリン、X-gal、1PTG、1.5%寒天を含む)にスポットして37℃で1晩培養することにより単離した。

単離した白いコロニーを2mlの2YT溶液培地(50μg/mlアンピシリンを含む)に白金耳で植え付け37℃で1晩培養した。培養液を1mlとり1.5mlのエッペンドルフチューブに移し、15000rpm、30秒間遠心して細胞を集めた。集めた細胞を1mlのSET buffer(20%ショ糖、50mMトリス塩酸、50mM EDTA、pH7.6)に懸濁し、15000rpm、1分間遠心して洗浄した。この細胞を再び150μlのSET bufferに懸濁し、5μlのRNase溶液(10μg/mlリボスクレアゼA(シグマ社製)、0.1M

酢酸ナトリウム、0.3mM EDTA、pH4.8)を加えボルテックスミキサーで十分混合した。これに350μlの溶菌液(1%SDS、0.2N NaOH)を加え、チューブを逆さにすることによりおだやかに攪拌し、完全に溶菌させた。この溶菌液を氷水中で10分間インキュベートした後、250μlの酢酸ナトリウム(pH4.8)を加え、十分混合し、さらに氷水中に30分間放置した。この混合液を15000rpm、4℃で10分間遠心してSDSおよび染色体DNAを沈殿として除いた。上清を別のエッペンドルフチューブに移し、等量のイソプロパノールを加えよく混合し、15000rpm、4℃で7分間遠心してプラスミドDNAを沈殿として集めた。沈殿を菌水に溶解し、一部を制限酵素HindIII、BamHI処理し、1.2%agaroseゲル電気泳動を行い475bpのDNA断片がpUC13に導入されていることを確認した。このようにして得られた組換えプラスミドをpUC13-h-SODと命名する。

II. h-SOD発現用ベクターの構築

(I-1) h-SOD遺伝子の調製

pUC13-h-SOD DNAをSDS-アルカリ法および塩化セシウム-エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離法(B. Perbal, A. Practical Guide to Molecular Cloning 140-144, John Wiley and Sons Inc, 刊)により大量に調製した。調製したpUC13-h-SOD DNA 80μl(40μg)と5×HindIII切断用バッファ(50mMトリス塩酸、35mM MgCl₂、300mM NaCl、pH7.5)30μl及びHindIII(宝酒造社製)80unitsに水を加えて150μlとしたエッペンドルフチューブ(1.5ml用)を10本用意し、37℃で3時間反応させた。反応後、フェノール:クロロホルム(1:1)、クロロホルム処理し、1/6容の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)、2.5容のエタノールを加え、-20℃で2時間以上放置した。生じたDNAの沈殿を15000rpm、4℃で10分間遠心し、70%エタノールで洗浄後、減圧乾固させた。残液を550μlの滅菌水

に溶解し、5つのチューブに110 μ lずつ分注した。それぞれのチューブに5 \times EcoRI 切断用バッファー(250mM トリス塩酸、35mM MgCl₂、500mM NaCl、35mM 2-メルカプトエタノール、0.05%ウシ血清アルブミン) 30 μ l及びEcoRI(宝酒造社製) 100unitsに水を加えて150 μ lとし、37 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。反応後、フェノール:クロロホルム(1:1)処理エタノール沈殿してDNAを回収した。目的とするh-SOD遺伝子(HindIII-EcoRI、約500bp)を2%アガロースゲルによる電気泳動を行って分離し、核酸精製用カートリッジNensorb20(Dupond社)を用いて精製した。

II-2. HincII-HindIII断片の合成

Shine Dalgarno(S/D)配列を含む発現調節領域の合成のために4つのオリゴヌクレオチド(第4図参照)をホスホアミダイト法により化学合成し、高速液体クロマトグラフィーにより精製した。5'末端をT,ポリヌクレオチドキナーゼとATPでリン酸化し、C, 1.53 μ g、C,

間熱処理して反応を止めた。目的のDNA断片(約570bp)を2%アガロースゲル電気泳動によって分離し、DNA精製用キットGeneclean[®](BIO101社製)を用いて精製した。

(II-4) lacプロモーター遺伝子の調整

lacプロモーターを有する大腸菌発現用ベクター-pKK223-3(ファルマシア社より購入)をSDS-アルカリ法と塩化セシウム-エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心法により大量調製した。pKK223-3 DNA溶液30 μ l(80 μ g DNA)、5 \times BamHI 切断用バッファー(50mM トリス塩酸、35mM MgCl₂、500mM NaCl、10mM 2-メルカプトエタノール、0.05%ウシ血清アルブミン、pH 8.0) 40 μ l及びBamHI(宝酒造社製) 240unitsに水を加えて200 μ lとしたエッペンドルフチューブ10本を用意し、30 $^{\circ}$ Cで3時間反応させた。反応後、フェノール:クロロホルム、クロロホルム処理し、DNAをエタノール沈殿して回収した。目的のDNA断片(269bp)を2%アガ

1.83 μ g、V1 0.73 μ g、V2 0.56 μ gを80 μ lの50mM トリス塩酸-10mM MgCl₂溶液に混合した。この溶液を90 $^{\circ}$ C、5分間加熱した後、2時間かけて4 $^{\circ}$ Cまで冷却し、100mM ジチオスレイトール、10mM ATPを10 μ lずつ加え、さらにT, DNAリガーゼ(酒造社製) 2.5unitsを添加して4 $^{\circ}$ Cで15時間インキュベートした。反応液をフェノール:クロロホルム、クロロホルム処理し、DNAをエタノール沈殿して回収した。

(II-3) h-SOD遺伝子(HindIII-EcoRI)と合成DNA断片(HincII-HindIII)の連結

II-2で調製した合成DNA断片(HincII-HindIII) 0.6 μ gとh-SOD遺伝子4.1 μ gを50mM トリス塩酸-10mM MgCl₂-10mM ジチオスレイトール-1mM ATP溶液(pH 7.6)に混合し、T, DNAリガーゼ3 μ unitsを添加して20 μ lとした。この反応液を10 $^{\circ}$ Cで15時間インキュベートした後、65 $^{\circ}$ Cで10分

間熱処理して反応を止めた。目的のDNA断片(約570bp)を2%アガロースゲル電気泳動によって分離し、DNAを電気的に溶出し、核酸精製用カートリッジNensorb20(Dupond社製)を用いて精製した。精製したDNA断片8 μ gを5 \times HincII 切断用バッファー(50mM トリス塩酸、35mM MgCl₂、300mM NaCl、35mM 2-メルカプトエタノール、pH 8.0) 9 μ l及びHincII(宝酒造社製) 30unitsにH₂Oを加えて45 μ lとして、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。反応後、65 $^{\circ}$ Cで10分間熱処理し、2.5%アガロースゲル電気泳動して、目的のDNA断片(191bp)を分離し、Nensorb20を用いて精製した。

(II-5) lacプロモーター遺伝子(BamHI-HincII)とHincII-EcoRI断片の連結

lacプロモーター遺伝子(191bp) 0.5 μ g、HincII-EcoRI断片1.5 μ gを10mM トリス塩酸-1mM EDTA-300mM NaCl溶液(pH 8.0) 9.68 μ lに混合し、Takara ligation kit(宝酒造) B液9.68 μ lを加え、2

6℃で1時間反応させた。反応後、DNAをエタノール沈澱して回収した。得られたDNAを20μlのBamHI 1000倍希釈用バッファー(10mMトリス塩酸、7mM MgCl₂、1.00mM NaCl、2mM 2-メルカプトエタノール、0.01%ウシ血清アルブミン、pH 8.0)に混合し、BamHIにunitsを加え、30℃で2時間反応させた。反応後、60℃で10分間熱処理して反応を停止させた。

(II-6) プラスミド(pKK223-3)のアルカリフوسفアターゼ処理

pKK223-3をBamHI処理して得られた約4320bpのDNA断片10μgを100μlの50mMトリス塩酸(pH 8.0)に混合し、10μlのアルカリフوسفアターゼ溶液(0.5unit sアルカリフوسفアターゼ(宝酒造社製)、10mMトリス塩酸、50mM NaCl、1mM ZnSO₄、pH 7.5)を加え、37℃で1時間インキュベートした。反応後、さらに10μlのアルカリフوسفアターゼ溶液を加え65℃で15分間

でO.D.600nm=0.3~0.5まで培養した大腸菌JM105株を8000rpm、4℃で5分間遠心して集め、25μlの10mM NaClで洗浄した。洗浄後、細胞を25μlの冷たい50mM CaCl₂に懸濁させた。この懸濁液を氷水中に20分間放置した後、ただちに細胞を遠心して(5000rpm、10分)集めた。集めた細胞を再び5μlの冷たい50mM CaCl₂におだやかに懸濁し、4時間氷冷することによりコンピテント細胞を得た。このコンピテント細胞懸濁液200μlに50ngのpKKh-SOD10を加え、0℃で60分間、ついで42℃で2分間熱処理し、ベクターを細胞に取り込ませた。この細胞液に2μlのLB培地を加え、37℃で1時間振盪培養した後、50μg/μlのアンプシリンを含む2YT寒天培地(16g Bacto トリプトン、10g Bacto酵母抽出液、5g NaCl、1.5%寒天)にプレーティングし、37℃で1晩培養した。このようにして得られたコロニーからプラスミドを調製し、制限酵素地図を解析することによって目的のプラスミ

ドをインキュベートし、2μlの250mM EDTAを加え反応を停止させた。DNAはエタノール沈澱して集め0.2μg/μlになるように10mMトリス塩酸-1mM EDTA(TE、pH 8.0)に溶解し、次の実験に使用した。

(II-7) pKK233-3とBamHI-BamHI(プロモーターとh-SOD遺伝子)の連結

BamHI-BamHIフラグメント(II-5で調製)50ng、pKK223-3(II-6で調製)280ngを11.4μlのTEに混合し、45.6μlのTakara ligation Kit A液および11.4μlのB液を加えて16℃で2時間反応させた。反応後、この液をE.coli JM105株の形質転換に用いた。

III. pKKh-SOD10の大量調製

(III-1) pKKh-SOD10による大腸菌JM105株の形質転換

50μlのLB培地(10g Bacto トリプトン、5g Bacto 酵母抽出液、10g NaCl)

を保持していることを確認した。

IV. h-SOD geneのラン藻 Anacystis nidulans 6301、R2による発現

(IV-1) A. nidulans 6301 (Synnechococcus PCC 6301) および R2 株

(Synnechococcus PCC 7942)の形質転換

75μlの液体培地(BG-11*)で15~30日間培養した細胞を8000rpm、5分間遠心して集め、75μlの新しい培地に移す。これを光照射下で1~3日間培養する。この細胞を8000rpmで5分間遠心して集め、1mM HEPES(pH 7.0)20μlおよび10μl、さらに形質転換用緩衝液(272mM シュガー、3mM リン酸カリウム(pH 7.4)、15%グリセロール)5μlで遠心洗浄する。得られた細胞のペレットを形質転換用bufferに懸濁し、10¹⁰cells/μl以上の濃度(好ましくは2×10¹⁰cells/μl)に調整し、形質転換用試料とした。

形質転換は津島製作所社製細胞融合装置SSH-

1を用いたエレクトロポレーション法によって行った。上記に調製した試料を50μlずつエペンドルフチューブに分注し、氷冷する。これに1~2μlのDNA溶液(終濃度が20~30μg/μlになるようにpKKh-SOD10をTE緩衝液に溶解したもの)を加え、攪拌したのち、エレクトロチャンバーに移す。ただちに500μsec、7.5kV/cmの条件でパルスをかけ、DNAを細胞中にとりこませる。パルス処理した細胞をすばやく1.9mMのBG-11培地に移し、暗所で1晩振盪培養する。この細胞を100~200μlずつBG-11寒天培地(1mM Na₂S₂O₃、1.0μg/μlアンピシリン、1.5% agarを含む)にまき、光照射下(2000ルクス)で7~10日間培養する。出現してまたコロニーを新しい寒天培地に移し、h-SODの発現を調べる。

*BG-11培地の組成(1ℓ中)

NaNO ₃	1.5g
K ₂ HPO ₄	40mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75mg

この膜を0.5%グルタルアルデヒド、0.05%ノニデットP-40を含む10mM PBSに4℃で1晩処理することにより膜上のタンパクの固定を行った。

膜に固定されたA. nidulansタンパク中のh-SODを抗h-SODを用いた酵素抗体により検出した。上記の膜を5%スキムミルク、0.1%ツイーン20を含むTBS(20mMトリス塩酸、0.9% NaCl、pH 7.4)に37℃で2時間処理した。この膜を洗浄液(0.1% BSAを含むTBS)で15分間(5分×3)洗い、1/1000抗h-SOD(ヤギIgG、Binding Site社製)、1% BSAを含むとともに室温で2時間インキュベートする。次に、同様に膜を洗浄した後、1/1000ペルオキシダーゼ抗ヤギIgG(Cappel社製)、1% BSAを含むTBSで室温、2時間インキュベートした。膜を洗浄液で20分間(5分×4)洗浄した後、10μgジアミノベンチジン(DAB)、15μlの32% H₂O₂を含む40μlの0.1M トリス-塩酸(pH 7.4)で染色させた。

CaCl ₂ · 2H ₂ O	36mg
EDTA	1mg
Na ₂ CO ₃	5mg
クエン酸アンモニウム鉄	6mg
クエン酸	6mg
H ₃ BO ₃	2.86mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.021mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.08mg
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.0295mg

(IV-2) h-SODの検出

形質転換で得られたコロニーを培養した寒天プレート上に1mMイソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)を含むBG-11をしみこませたニトロセルロース膜(アマシヤム社製、HybondC)をのせ、光照射下で1日培養した。培養後、はがしたニトロセルロース膜を0.3% H₂O₂を含む50%メタノールに20分間ひたし、内性のペルオキシダーゼを失活させた。さらに、

その結果、100個のコロニーのうち23個のコロニーが茶褐色に染まり、h-SODの発現を確認した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は組換えプラスミドの調製のための製造工程図であり、

第2図はh-SOD遺伝子の化学合成における該遺伝子のDNA断片の塩基配列図であり、

第3図はh-SOD遺伝子の作製方法を示す工程図であり、

第4図は発現調節領域の合戦のための工程図である。

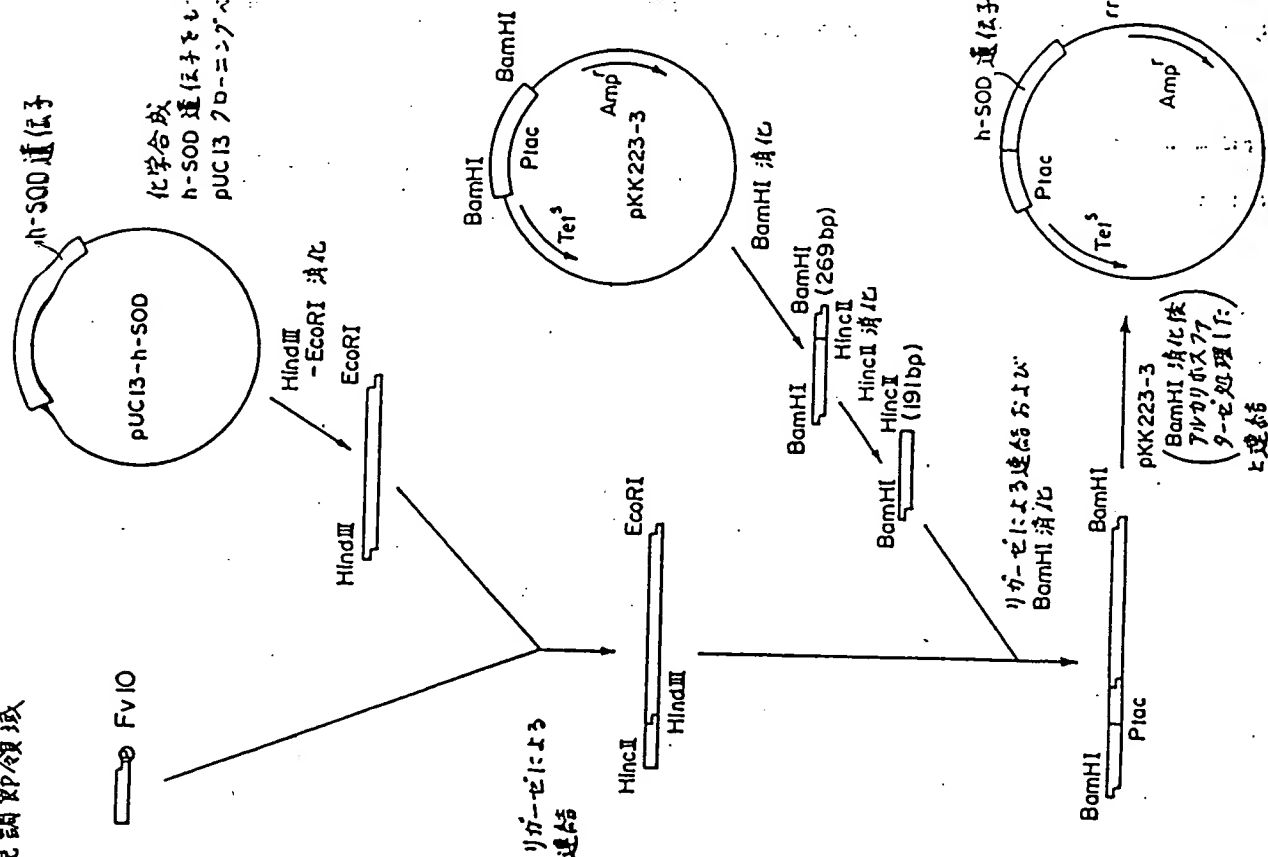
特許出願人 灰 原 義 秀

同 東京薬品開発株式会社

代理人 弁理士 小田島 平 吉

同 弁理士 江 角 洋 治





A GCTTATGGCT ACCAAAGCTG TTTGCGTTCT GAAAGGTGACGGCCCGGTTT AGGGTATC AT CAACTTCGAA CAGAAAGAAT CTAACGGTCCG
 ATACCGA TGGTTTCGAC AAACGCAAGA CTTTCAC TGCCGGGCCAAG TCCCATAGTA GTTGAAGCTT GTCTTTCTTA GATTGCCA
 9 10

GTAAAGTTTGGGGTTCTA TCAAAGGC CT GACCGAAGGT CTGCATGGAT TCCATGTTCA TGAATTTGGTGACAACACTG CAGGTTGC AC C
GG CCAATTTCAAACCCCAAGAT AGTTTCCGGA CTGGATTCCA GACGTACCTA AGGTACAAG T ACTTAAACCACTGTTGTGAC GTCCAACGTG

TCTGCAGGG CCTCATTTC ACCCCGTGTC GCGTAAACATGGTGGGCCGA AAGACGAAGA ACG TCATGTT GGTGACTAGG TAACGTTACC G
GAGACGTCCC GGAGTAAAGT TGGGCGA CAG CGCATTGTACCACCCGGCT TTCTGCTTCT TGCAGTACAA CCACTGATCC ATTGCAA

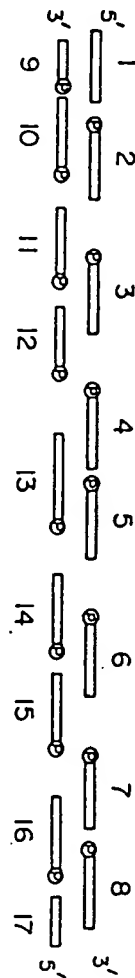
5
CTGACAAAGACGGTGTCTGC TGACGTT TCT ATCGAAGACT CTGTTATCTC TCTGTCTGGT GACCATTCATCATCGGTCG TACTCTG GTT
TGG CGACTGTTTCTGCCACAGCG ACTGCAAAGA TAGCTTCTGA GACAATAGAG AGACAGA CCA CTGGTAACGTAGTAGCCAGC ATGAGAC
14

GTTCATGAAA AAGCGGATGA C⁷TGGGTAAA GGTGGTAACGAGGAATCTAC CAAAACC GGT AACGCTGGTT CTCGTCTGGC ATGCGGTGTT⁸
CAA CAAGTACTTT TTGCCTACT GGACCCA TTT CCACCATGCTCCTTAGATG GTTTGGCCA TTGCGACCAA GAGCAGACCG TACG
15 16

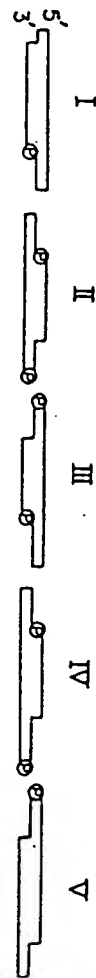
ATCGGTATCGCTCAGTAGTG AG
CCACAA TAGCCATAGCGAGTCATCAC TCCTAG

第3図

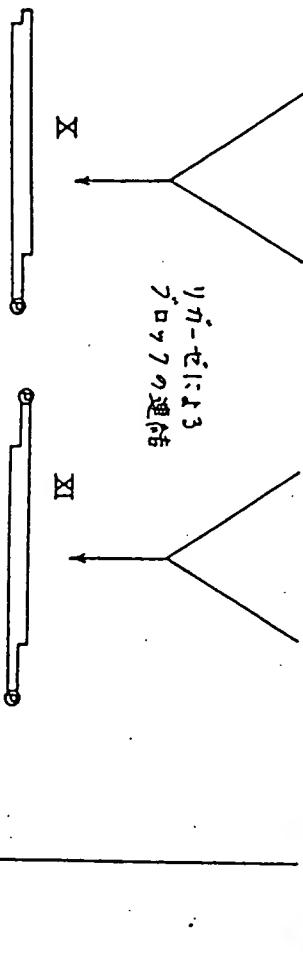
オリゴヌクレオチドの化学合成と5'末端のリン酸化



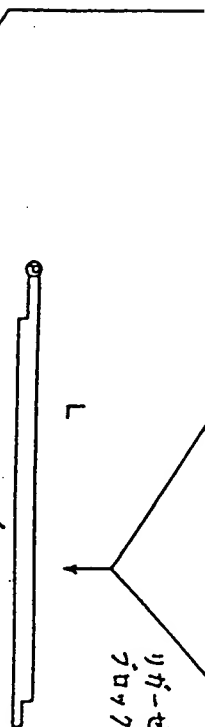
リン酸とリガーゼによる
連結 (ブロッグの合成)



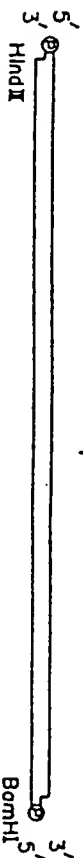
リガーゼによる
ブロッグの連結



リガーゼによる
ブロッグの連結



リガーゼによる
ブロッグの連結と
5'末端のリン酸化



第4図

